

J1002 U.S. PTO

10/071476



대한민국 특허청

KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

#11

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원번호 :
Application Number

특허출원 2001년 제 6587 호
PATENT-2001-0006587

출원년월일 :
Date of Application

2001년 02월 10일
FEB 10, 2001

출원인 :
Applicant(s)

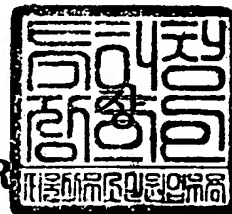
(주)알에이싸이언스 외 1명
RA-SCIENCE CO., et al.



2001 년 07 월 10 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2001.02.10
【발명의 명칭】	펩타이드 벡터
【발명의 영문명칭】	Peptide vector
【출원인】	
【명칭】	(주)알에이싸이언스
【출원인코드】	1-2001-003719-5
【출원인】	
【성명】	채영진
【출원인코드】	4-2001-003720-0
【대리인】	
【성명】	박승문
【대리인코드】	9-1999-000536-0
【포괄위임등록번호】	2001-005323-0
【포괄위임등록번호】	2001-005320-8
【대리인】	
【성명】	조용식
【대리인코드】	9-1999-000634-5
【포괄위임등록번호】	2001-005324-7
【포괄위임등록번호】	2001-005321-5
【대리인】	
【성명】	안소영
【대리인코드】	9-2000-000155-5
【포괄위임등록번호】	2001-005325-4
【포괄위임등록번호】	2001-005322-2
【발명자】	
【성명】	채영진
【출원인코드】	4-2001-003720-0
【심사청구】	청구
【조기공개】	신청

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】**【서열개수】** 5**【서열목록의 전자문서】** 첨부

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 심사청구, 특허법 제64조의 규정에 의한 출원공개를 신청합니다. 대리인
 박승문 (인) 대리인
 조용식 (인) 대리인
 안소영 (인)

【수수료】**【기본출원료】** 17 면 29,000 원**【가산출원료】** 0 면 0 원**【우선권주장료】** 0 건 0 원**【심사청구료】** 5 항 269,000 원**【합계】** 298,000 원**【감면사유】** 소기업 (70%감면)**【감면후 수수료】** 89,400 원

【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 소기업임을 증명하는 서류_통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 펩타이드 벡터에 관한 것으로, 세포특이성을 갖지 않고 모든 세포에 유전자 전달이 가능하며 숙주의 면역반응을 피할 수 있는 펩타이드 벡터에 관한 것이다.

【대표도】

도 1

【명세서】**【발명의 명칭】**

펩타이드 벡터{Peptide vector}

【도면의 간단한 설명】

도1은 본 발명의 펩타이드 벡터가 목적유전자와 결합하는 메커니즘을 개략적으로 나타낸 도이다.

도2는 뇌, 근육 조직의 mRNA 발현정도를 PCR을 이용하여 확인한 도이다.

【발명의 상세한 설명】**【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

- <3> 본 발명은 펩타이드 벡터에 관한 것으로, 세포특이성을 갖지 않고 모든 세포에 유전자 전달이 가능하며 숙주의 면역반응을 피할 수 있는 펩타이드 벡터에 관한 것이다.
- <4> 유전자를 생체에 도입하는데 이용되는 벡터는 주로 바이러스 벡터(viral vector)가 사용되어왔다. 바이러스 벡터는 바이러스의 세포내 침투능력을 이용하는 것으로 아데노바이러스, 헤르페스바이러스, 레트로바이러스 등이 주로 이용되었다.
- <5> 아데노바이러스는 비엔벨로프(non-enveloped) 이중가닥 DNA 바이러스이며 사람에서 가벼운 상기도염증(upper respiratory tract infections), 각결막염, 위장염 등을 일으키는 바이러스이다. 아데노바이러스의 게놈은 약 36kb정도이며 고전적인 재조합 DNA 기술로 쉽게 다룰 수 있다. 바이러스의 세포내 침투는 아데노바이러스의 섬유혹 단백질(fibre knob protein)과 세포 표면의 Coxackie & Adenovirus receptor(CAR)의 결합에

의해 시작되며 이어 세포 표면의 인테그린($\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$)과 캡시드 펜톤 베이스의 상호작용에 의해 바이러스 입자는 클라트린막을 매개한 세포내이입(clathrin coated endocytosis)에 의해 세포 안으로 들어간다. 이후 엔도솜의 낮은 pH에 의해 바이러스입자 캡시드 단백질(virion capsid protein)의 형태 변화가 유도되고 이러한 변화에 의해 바이러스입자 캡시드 단백질은 세포질로 유리된다. 이후 캡시드 단백질은 핵으로 이동하고 이곳에서 복제와 전사를 수행한다. 유전자 전사는 복제가 일어나기 전에 발현되는 초기유전자(E)와 복제가 시작된 이후에 발현되는 후기유전자(L) 두가지 종류로 나뉜다. 유전자치료에 이용되는 아데노바이러스 벡터는 E1 유전자 영역이 결실되어 불완전한 복제가 되어 이곳에 다른 DNA가 삽입된 형태로 사용된다. 따라서 재조합 아데노바이러스 벡터는 지속적으로 E1 유전자를 발현하는 HEK293 등의 세포주에서 배양함으로 증식시킨다.

<6> 레트로바이러스는 엔벨로프를 가지고 있는 단일가닥 RNA 바이러스로 7~10kb 정도의 이배체 게놈(diploid genome)을 가지고 있으며

gag, *pro*, *pol*, *env*라고 불리우는 네가지의 유전자 그룹으로 이루어져 있다. 이들은 각각 구조적 캡시드 단백질, 바이럴 프로테아제, 인테그라제와 역전사효소 그리고 엔벨로프 당단백질 등을 암호화한다. 레트로바이러스는 말단반복배열(long-terminal repeat : LTR)이라고 부르는 패킹신호(Ψ)와 시스-액팅 서열(cis-acting sequence)을 가지고 있다. 레트로바이러스가 세포에 감염되기 위해서는 먼저 엔벨로프 당단백질과 세포표면의 수용체가 결합을 하게되고 이어서 바이러스의 엔벨로프와 세포막의 융합이 일어나 캡시드 핵이 세포 안으로 들어가게 된다. 일단 세포질에 들어가면 캡시드 내부에서 역전사효소에 의해 이중가닥 프로바이럴 게놈이 만들어지며 이는 인테그라제와 복합체를 이루어 핵막으로 이동한 후 유사분열(mitosis) 과정에서 핵막이 소실된 상태에서 핵으로 들어가게 된다. 핵 내부로 들어간 프로바이럴 게놈은 인테그라제에 의해 숙주의 염색체 안으로 끼어 들어가 숙주의 전사장치에 의해 바이럴게놈이 발현된다. 재조합 레트로바이러스 벡터는 모든 레트로바이러스 유전자가 마커 혹은 치료 유전자로 대체되고 LTRs와 Ψ 서열만이 남아있기 때문에 상기 설명한 아데노바이러스 벡터와는 달리 어떤 바이러스 유전자도 발현되지 않는다. 이러한 재조합 레트로바이러스를 증식시키기 위해서는 바이러스 유전자인 *gag*, *pol*, *env*를 트랜스로 발현시켜야 하며 이것은 이들 유전자를 안정적으로 발현하는 세포주를 이용함으로써 가능하다.

<7> 아데노-결합 바이러스는 파르보비리대 과(parvoviridae family)이며 짧은 단일가닥 DNA 게놈을 가지고 있는 간단한 바이러스이다. 아데노-결합 바이러스는 *rep*(조절), *cap*(구조)이라고 부르는 두개의 전사해독프레임(open reading frame : ORF)과 두개의 작은 역위반복배열(inverted terminal repeats : ITRs)로 구성된다. 역위반복배열은 encapsidation과 숙주 게놈으로의 통합(integration)에 필요한 유일한 부분이며 사람의

19번 염색체에 안정적으로 통합된다. 그러나 이 바이러스는 스스로 증식능력을 가지지 못하며 아데노바이러스 혹은 헤르페스바이러스 등의 보조바이러스(helper virus)의 존재 하에 증식이 가능하다. 재조합 아데노-결합 바이러스는 역위반복배열 사이에 전사단위가 끼어 들어가 있는 플라스미드와 *rep*, *cap* 전사해독프레임이 들어있는 플라스미드의 공통질감염에 의해 만들어지며 이때 아데노바이러스 등의 보조바이러스 감염이 필요하다. 이후 재조합 아데노-결합 바이러스의 정제과정을 거쳐 유전자치료에 사용한다.

<8> 단순포진 바이러스(Herpes simplex virus)-1은 엔벨로프를 가지고 있는 이중가닥 DNA 바이러스이다. 152kb의 게놈에서 80개 이상의 유전자를 암호화하고 있으며 모든 세포막에서 발견되는 세포외 황산헤파란(extracellular heparan sulphate)에 엔벨로프 당단백질(gB, gC)이 결합함으로써 대단히 넓은 숙주범위를 가진다. 바이러스가 숙주의 세포 안으로 들어갈때 바이러스의 엔벨로프 당단백질 gD와 숙주의 섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factor : FGF) 수용체가 요구된다. 단순포진 바이러스 벡터에는 재조합 단순포진 바이러스 벡터와 암플리콘 벡터(amplicon vector)의 두 가지 타입이 있으며 재조합 단순포진 바이러스 벡터는 직접 단순포진 바이러스 게놈에 전사단위가 삽입되어 있는 것이며, 암플리콘 벡터는 전사단위와 복제개시점(replication origin), 패키징 신호를 포함하고 있는 플라스미드를 세포주에 형질감염 시키고 여기에 보조바이러스를 감염시켜 만든다. 암플리콘벡터는 회전환 복제(rolling circle replication) 되며, 패키징시에 다중복사 유전자(multiple copy gene)의 삽입을 가지는 단순포진 바이러스가 만들어진다.

<9> 위에서 살펴본 바이러스 벡터는 각각 나름대로의 장단점을 가지고 있다. 대부분 바이러스 벡터의 공통적인 문제점은 감염이 가능한 즉 전달 가능한 세포의 범위가 제한되

어 있고 숙주의 면역반응에 의한 벡터의 불활성이다. 따라서 이러한 벡터는 바이러스 종류 나름대로의 한계성을 가지며 아직까지 모든 세포에 적용하지 못하고 있다.

<10> 이러한 문제점을 해결하기 위하여 많은 연구가 이루어지고 있으며, 이러한 연구들의 대부분은 바이러스의 트로피즘(tropism)을 변형시켜 특정세포에 감염시키는 것과 특정세포에 선택적인 프로모터(cell type specific promoter)를 이용하여 특정한 세포에서만 트랜스유전자(transgene)를 발현시키고자 하는 연구이다. 그러나 아직까지 이 두 가지 연구분야에서 만족할 만한 결과는 나오지 않고 있다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<11> 본 발명의 목적은 세포특이성을 갖지 않고 모든 세포에 유전자 전달이 가능하며 숙주의 면역반응을 피할 수 있는 펩타이드 벡터를 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

<12> 본 발명은 펩타이드 벡터에 관한 것으로, 세포특이성을 갖지 않고 모든 세포에 유전자 전달이 가능하며 숙주의 면역반응을 피할 수 있는 펩타이드 벡터에 관한 것이다.

<13> 이하, 본 발명의 펩타이드 벡터에 대하여 보다 구체적으로 설명하면 다음과 같다.

<14> 본 발명의 펩타이드 벡터는 리더펩타이드와 링커 DNA로 이루어져 있다.

<15> 리더 펩타이드(Leader peptide, 서열번호 1)는 다음과 같은 구조로 이루어져 있으며, 이는 레트로바이러스, 파라믹소바이러스(paramixovirus) 등 엔벨로프를 가지는 여러 가지 바이러스에서 세포막 융합기능을 가질 것으로 예상되는 단백질들을 분석함으로써 유추한 서열이다. 이러한 서열은 세포막을 직접 통과하여 세포안으로 들어간다.

<16> < 리더펩타이드 : 서열번호1 >

<17> Ac-Gly-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gly-Arg-Arg-Cys

<18> 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

<19> (변이체) Ile Leu Arg Lys Leu

<20> Ile

<21> Arg

<22> Gln

<23> Asn

<24> Ser

<25> * N-말단 아세틸레이션(Ac) : 다른 분자들과의 반응성을 없애기 위해 N-말단의 아민기에 아세틸기를 붙임.

<26> * C-말단 Cys : 링커 DNA와 S-S bond로 결합시키기 위하여 C-말단에 시스테인(Cys)을 붙임.

<27> N-말단 부분에 있는 4개의 아미노산은 비극성이면서 지방족 측쇄(aliphatic side chain)로 구성되어 있어 세포막으로 쉽게 침투가 가능하며, 다음 두개(5번, 6번)의 아미노산은 극성이면서 전하를 띠지 않기 때문에 1~4번의 아미노산들이 세포막에 삽입되었을 때 안정성을 유지할 수 있다. 7~15번째의 아미노산은 주로 pKa가 대략 10이상이 되는 염기성 아미노산들로 구성되어 세포 안쪽의 음전하에 의해 세포내부로 밀고 들어갈 수 있다. 13번째 아미노산은 극성이면서 전하를 띠지 않는 측쇄(Asn, Gln, Ser 등), 비극성

이면서 지방족 측쇄(Ala, Leu, Ile 등) 또는 염기성 측쇄(Arg 등)를 갖는 아미노산으로 어떤 것이 오더라도 전체의 기능에는 영향을 미치지 않는다. 이와같은 구조로 되어있는 펩타이드는 세포막의 수용체에 결합하여 세포내로 들어가는 것이 아니고 직접 세포막을 뚫고 들어가므로 궁극적으로 막 구조로 이루어져 있는 모든 세포에 적용될 수 있다.

<28> 링커 DNA(linker DNA와)는 리더 펩타이드와 목적유전자를 연결해주는 것으로 15~18 개의 염기로 구성되어 있으며, 다음과 같은 구조를 갖는다.

<29> 링커-1(서열번호 2) : 5'- Cys-CTA-ATA-CGA-CTC-ACT-AT -3'

<30> 링커-2(서열번호 3) : 3'- GAT-TAT-GCT-GAG-TGA-T -5'

<31> 링커-1 DNA는 리더펩타이드와의 결합을 위하여 5' 말단에 시스테인을 접합하고, 링커-2 DNA는 목적유전자와의 결합을 위하여 T₄ 폴리키나제를 이용하여 5' 말단에 인산기를 붙인다.

<32> 링커 DNA의 상보적인 이중가닥 중 한가닥(링커-1, 서열번호 2)만이 리더 펩타이드와 공유결합을 이루고 있으며 이후 목적유전자와 결합시에는 리더 펩타이드와 공유결합을 이루고 있지 않은 가닥(링커-2, 서열번호 3)만이 목적유전자와 공유결합을 이루고 있어 핵내의 환경에서 쉽게 리더 펩타이드와 분리될 수 있다. 이후 분리된 유전자의 양쪽 끝에는 단일가닥으로 이루어져 있기 때문에 쉽게 숙주의 염색체 내부로 통합(integration)이 가능하다.

<33> 목적유전자를 알칼린인산효소로 처리하여 5' 말단 인산기를 제거하면, 벡터와 결합

할 때 링커-1 DNA와 결합되는 것을 방지할 수 있다.

<34> 제한효소에 의한 분해시 생기는 오버행(overhang)을 채우기 위하여 Taq 폴리머라제를 이용하여 충전(filling) 및 말단 아데닐레이션(terminal adenylation)을 하면, 말단 아데닐레이션은 벡터와의 결합시 링커 DNA의 T 오버행과 상보적이므로 쉽게 결합될 수 있다.

<35> 목적유전자로 사용될 수 있는 유전자는 치료용 유전자, 특정 형질발현 유전자등 목적에 따라 다양한 유전자를 사용할 수 있다. 프로모터 및 인핸서는 각 목적유전자에 따라 적합한 것을 선택하여 사용할 수 있다.

<36> 벡터와 트랜스유전자의 복합체 주입 적정량은 벡터와 트랜스유전자 복합체에 의한 급성독성의 정도에 따라 결정한다. 트랜스 유전자의 전달과 발현여부는 대뇌, 소뇌, 간, 신장, 심장, 폐, 근육, 고환 등의 조직의 DNA 와 mRNA를 분리하여 각각 PCR 및 RT-PCR 기법을 이용하여 확인한다.

<37> 도1에 본 발명의 펩타이드 벡터가 목적 유전자와 결합하는 메커니즘을 나타내었다.

<38> 이하, 본 발명의 실시예를 더욱 구체적으로 설명하나, 본 발명이 이들 실시예로 한정되는 것은 아니다.

<39> 실시예 1 : 펩타이드 벡터의 합성

<40> 리더펩타이드(서열번호 1)는 Fmoc-고상법으로 합성하였다.

<41> 링커-1 DNA(서열번호 2)는 리더펩타이드와의 결합을 위하여 5' 말단에 시스테인을 접합하였고, 링커-2 DNA(서열번호 3)는 목적유전자와의 결합을 위하여 T₄ 폴리키나제를

이용하여 5' 말단에 인산기를 붙였다.

<42> 리더 펩타이드와 링커-1 DNA를 각각 2 nmol씩을 S-S bond로 결합시키기 위하여 완충용액(50mM Tris, 0.1mM EDTA, 10mM DTT, pH 10.5), 37℃에서 1시간 반응시켰다. 링커-1 DNA와 5' 말단에 키네이션(kination)된 링커-2 DNA의 하이브리다이제이션을 위하여 2 nmol의 링커-2 DNA를 첨가한 후 60℃에서 30분간 반응시켰다. 이후 100 pmol(20 pmol/ μ l)씩 분주한 후 -20℃ 이하에서 보관하였다.

<43> 실시예 2 : 목적 유전자의 준비

<44> pCX-GFP를 대장균에 형질전환한 후 배양하여 Quagen kit를 이용하여 플라스미드를 추출하였다. 추출한 플라스미드는 GFP가 포함된 부분을 잘라내기 위하여 Bam H1과 Sal I 로 처리한 후 0.8% 아가로스겔(agarose gel)에서 전기영동하여 원하는 부위의 밴드를 잘라 실리카를 이용하여 정제하였다.

<45> 정제된 GFP 유전자 5 μ g을 알칼린인산효소를 처리하여 5' 인산기를 제거하였다. 알칼린인산효소 반응이 끝난 후 알칼린인산효소를 제거하기 위하여 페놀/클로로포름/이소아밀알콜(phenol/chloroform/isoamylalcohol)을 이용하여 정제한 후 이소프로판올, 에탄올을 이용하여 침전, 정제 하였다. 이후 제한효소에 의한 분해시 생기는 오버행을 채우기 위하여 Taq 폴리머라제를 이용하여 충전(filling) 및 말단 아데닐레이션(terminal adenylation)을 하였다. 이후 다시 페놀/클로로포름/이소아밀알콜 및 이소프로판올, 에탄올을 이용하여 정제하였다.

<46> 실시예 3 : 벡터와 목적유전자의 결합

<47> 상기 실시예 1에서 제조된 벡터 100pmol과 상기 실시예 2에서 준비된 목적유전자 2 μ g을 결합하기 위하여 결합완충용액(50mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 10mM DTT, 1mM ATP, pH 7.5)에서 T₄ 리가제를 이용하여 16℃에서 4시간 반응시켰다.

<48> 실시예 4 : mRNA 추출 및 RT-PCR 측정

<49> 뇌, 근육 조직의 mRNA를 추출한 후, cDNA를 합성한 후 PCR을 이용하여 각 조직에 주입된 트랜스유전자의 발현을 확인하였다.

<50> 상기 실시예 3에서 제조된 트랜스유전자를 수컷쥐(몸무게 200g)에 500ng/1일을 1일, 3일, 5일 정맥으로 주입시키고, 6일째 되는날 수컷쥐를 안락사 시킨 후 뇌, 근육등의 조직을 채취하여 mRNA purification kit(ambion 사, Cat No. 1918)를 이용하여 mRNA를 추출하였다.

<51> 추출한 mRNA 1 μ g, 올리고-dT 또는 랜덤 프라이머(random primer) 50pmol, RNase 저해제(40 unit)를 넣은후 증류수로 부피를 50 μ l로 맞추고, 96℃에서 10분간 변성(denaturation)시키고, 60℃에서 30분간 어닐링(annealing)시켰다. 반응완충액, 1.25mM dNTP, 2mM DTT, RNase 저해제(40 unit), MMLV 역전사효소(200 unit, ambion 사)를 넣고 42℃에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난후 이소프로판올과 에탄올로 침전, 정제한 후, 증류수에 녹였다.

<52> cDNA를 합성한 후 GFP 특이적인 프라이머[GFP-f(서열번호 4), GFP-r(서열번호 5)]를 Taq 폴리머라제(Takara 사)를 이용하여 PCR을 시행하였다. PCR이 끝난후 2% 아가로스

겔에서 전기영동하여 밴드를 확인하였다.

<53> < GFP 특이적인 프라이머 >

<54> GFP-f : 5'-TGAAGGTGATGCAACATACGG-3' (서열번호 4)

<55> GFP-r : 5'-GTCTTGTAGTTCCCGTCATC-3' (서열번호 5)

<56> PCR의 결과는 도2에 나타내었으며, 레인 1은 뇌, 레인 2는 근육, 레인 3,4는 음성 대조군, 레인 5는 양성대조군, 레인 6은 사이즈마커이다. 사이즈마커는 위에서부터 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72 bp를 나타낸다.

<57> 도2에서 나타나듯이, 레인 1(뇌)과 레인 2(근육)의 234 bp 위치에서 GFP cDNA의 강한 밴드를 확인하였다. 따라서 뇌와 근육조직에서 효과적으로 발현됨을 알 수 있다.

【발명의 효과】

<58> 본 발명의 펩타이드 벡터는 기존의 바이러스 벡터와는 달리 조직 특이적인 트로피즘이 없이 궁극적으로 모든 세포에 유전자 전달이 가능하며 벡터의 크기가 헵텐(hepten) 수준이기 때문에 숙주의 면역반응은 전혀 유발되지 않는다.

<59> 본 발명의 펩타이드 벡터는 유전자 치료의 적용 뿐만 아니라 일반적인 세포배양시의 유전자 형질감염에서부터 형질전환 동식물의 생산에 이르기까지 광범위한 응용이 가능하며, 인간유전체연구(human genome project)가 완성된 이후의 유전자 기능 연구의 속도를 가속화시킬 수 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

리더펩타이드와 링커 DNA로 이루어짐을 특징으로 하는 펩타이드 벡터

【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 리더펩타이드는 서열번호 1로 이루어짐을 특징으로 하는 펩타이드 벡터

【청구항 3】

제1항 내지 제2항에 있어서, 상기 링커 DNA는 서열번호 2와 서열번호 3으로 이루어짐을 특징으로 하는 펩타이드 벡터

【청구항 4】

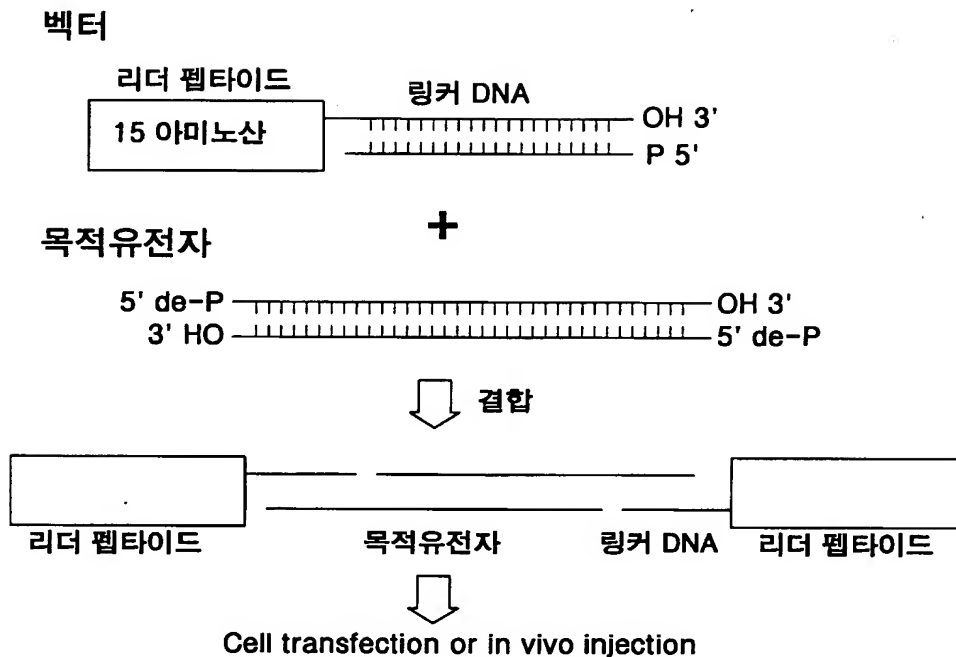
서열번호 1의 펩타이드와 서열번호 2와 3의 DNA로 이루어진 펩타이드-DNA 복합체

【청구항 5】

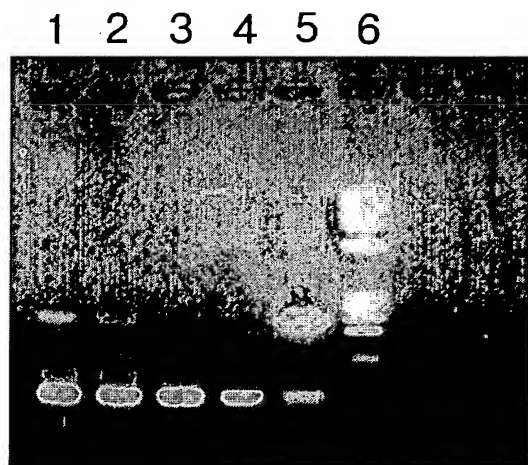
서열번호 1의 펩타이드와 서열번호 2의 DNA를 공유결합시키고, 서열번호 2의 DNA에 서열번호 3의 DNA를 하이브리다이제이션 하는 것으로 이루어진 펩타이드-DNA 복합체를 제조하는 방법

【도면】

【도 1】



【도 2】



【서열목록】

<110> CHAE, Young Jin; RA-science Co.

CHAE, Young Jin <120>

Peptide vector <130> 01p10 <160>

5 <170>

KopatentIn 1.71

<210> 1 <211>

16 <212>

PRT <213>

Artificial

Sequence <220> <223> N-terminal Gly is acetylated, 2nd a.a can be replaced by Ile, 4th a.a can be replaced by Leu, 10th a.a can be replaced by Arg, 11th a.a can be replaced by Lys, 13th a.a can be replaced by one of Leu, Ile, Arg, Gln, Asn and Ser. <400> 1 Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Ly Lys Arg Arg Gly Arg Arg Cys 1 5 10

15 <210> 2 <211> 17 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Linker-1 DNA : 5' end of C forms ester bond with Cys. <400> 2 ctaatacgac tcactat

17 <210> 3 <211> 16 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Linker-2 DNA <400> 3 tagtgagtcg tattag

16 <210> 4 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> GFP-f specific primer <400> 4 tgaaggtga gcaacatacg g 21 <210> 5

<211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> GFP-r specific primer <400> 5 gtcttgtagt tcccgatc